

学位論文内容要旨

北里大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 生薬学教室

学籍番号 DP-16103

氏名 小西 成樹 印

題目 「マイクロフローリアクター式配糖化法を利用したサポニン誘導体ライブラリーの構築とその性質に関する研究」

【緒言】

生薬等に含有されるサポニンは界面活性剤や漢方薬の主成分として知られ、様々な生物活性が報告されている¹⁾。本学北里生命科学研究所・感染制御科学府においても、去痰薬に用いられるオンジ (*Polygala tenuifolia* Willd., ヒメハギ科) 含有成分であるオンジサポニン A, E, F, G の経鼻接種インフルエンザ粘膜ワクチンアジュバント活性が報告された²⁾。当研究室では、アグリコンと糖鎖をそれぞれオレアノール酸と D-glucose とした単純な構造の合成サポニン誘導体が、アジュバント活性を発現することを明らかにした³⁾。

しかし、サポニン成分単体のアジュバント等への応用例は限られており次の様な理由が考えられる。

- 1) 供給法の課題があり、単離法では多種類縁体の存在により個々のサポニンの含有量・単離収率が低下し、全合成法では複雑な糖鎖部位の構築に保護基の脱着を多工程要し総収率の低下を招く。
- 2) *in vivo* アジュバント活性試験の様に 1 回の実験を行う化合物の種類には制限があり、多種のサポニンのスクリーニングを行うには困難が生じる。

そこで、筆者は上記の課題に対し次の様な実験を行った。

- 1) 供給面の解決にマイクロフローリアクター (以下フローリアクターと称す) 式配糖化法⁴⁾を用いることとした。さらにこの配糖化法を利用してアグリコンと糖の構造多様性を指向したサポニン誘導体ライブラリーの構築を行った。
- 2) *in vivo* アジュバント活性試験に供給する化合物を選別する目的で、*in vitro* 溶血作用と界面活性作用との相関性を基に *in vivo* 試験プロトコル及び試験結果の予測モデルの確立を試みた (Figure 1)。

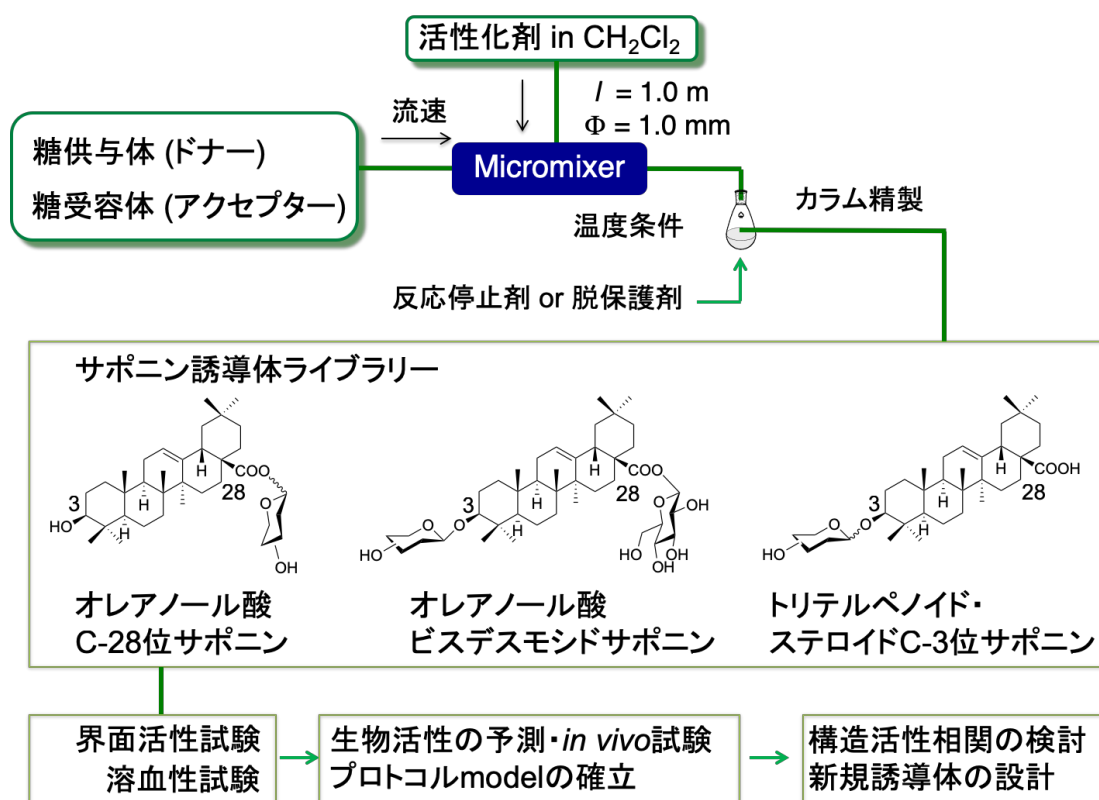
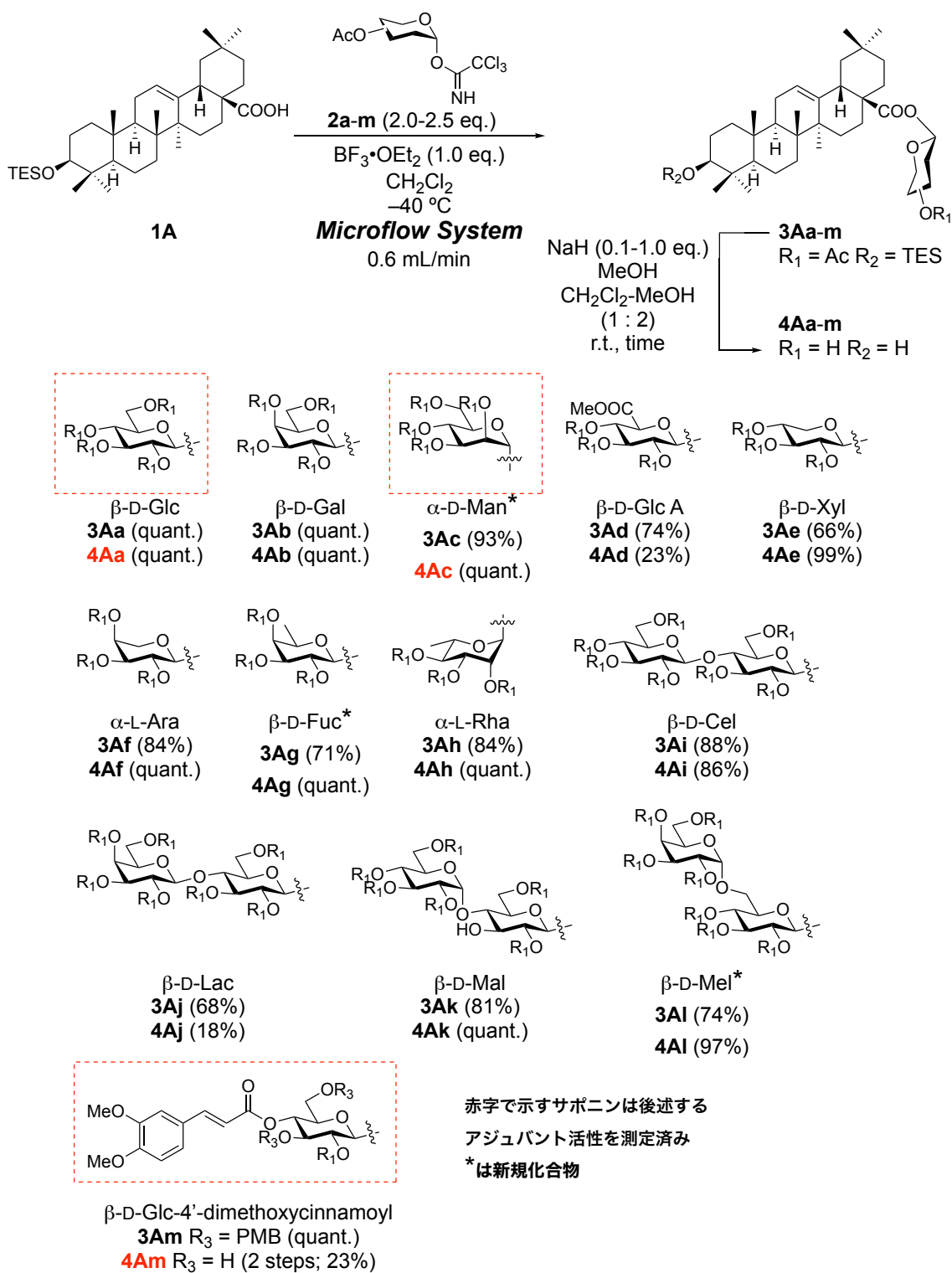


Figure 1 本研究の概要

【サポニン誘導体ライブラリーの構築】

1. マイクロフロー式オレアノール酸 C-28 位配糖化の検討とサポニンの合成⁵⁾

オレアノール酸の C-28 位を配糖化するにあたり、フローリアクターである comet X-01⁶⁾を用いた。フロー式反応は従来のフラスコ等を用いたバッチ式反応と比較し、反応時間や温度の制御・再現性の高さ・連続合成を容易に実施できる等の特徴がある。検討の結果、流速 0.6 mL/min の条件下で 1 当量の C-3 位トリエチルシリル (TES) オレアノール酸糖受容体 **1A** (アクセプター, 以下大文字アルファベットの化合物番号はアクセプターの種類を示す) に対し、2 当量のアセチル (Ac) D-glc イミデート糖供与体 **2a** (ドナー, 以下小文字アルファベットの化合物番号はドナーの種類を示す) と 1 当量の $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いた場合に定量的 C-28 位配糖化が進行することを見出した。続いて種々の Ac イミデートドナー **2a-m** を用い同条件下で配糖化後、得られた配糖体 **3Aa-m** の脱保護を行い 13 種類のオレアノール酸 C-28 位サポニン誘導体 **4Aa-m** を以下に示す収率で合成した (Scheme 1)。

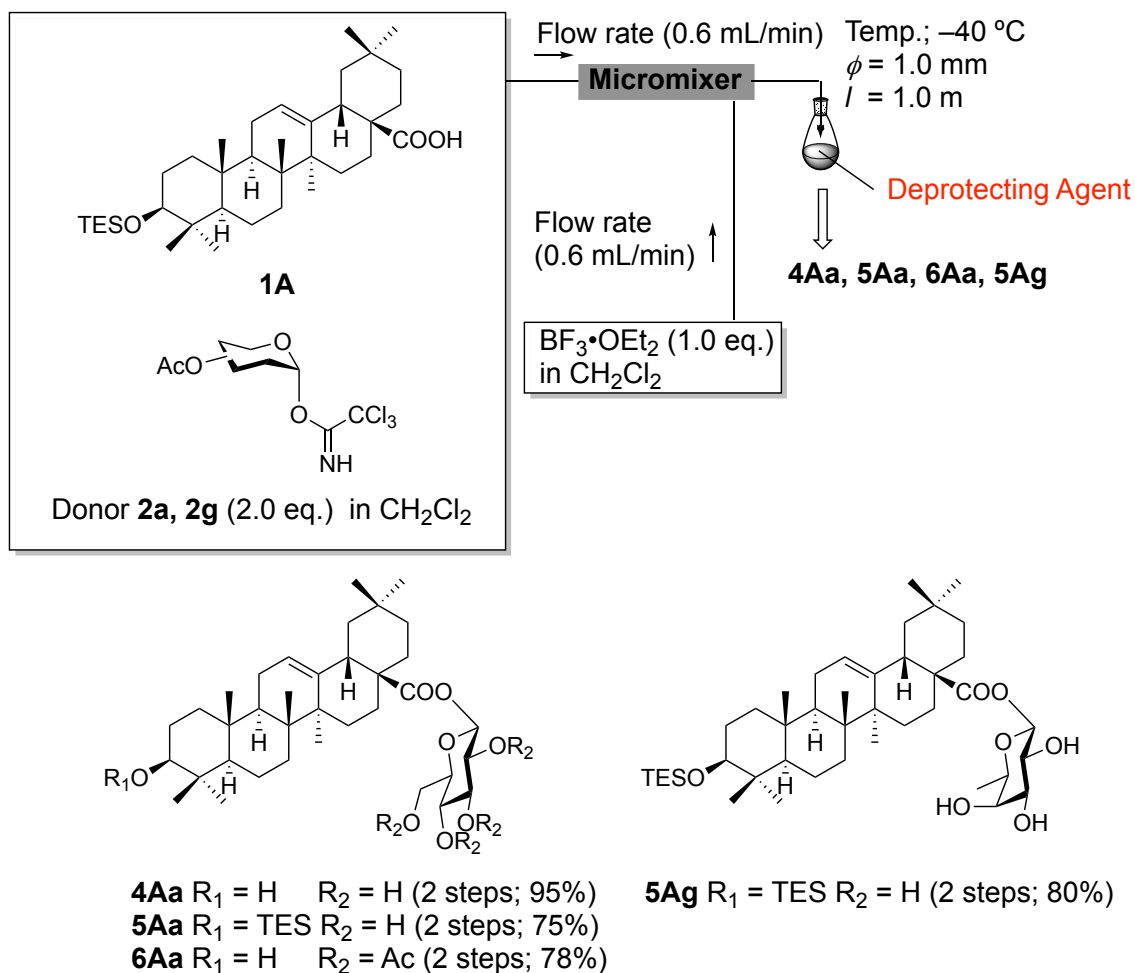


Scheme 1 マイクロフロー式 C-28 位配糖化法を用いた C-28 位サポニン合成

2. マイクロフロー式 C-28 位配糖化・バッチ式脱保護連続反応の検討⁹⁾

筆者は前述したマイクロフロー式配糖化条件を基に、配糖化・脱保護連続反応の検討を行った。即ち、副生成物の生成なく配糖体を合成した後、反応停止剤の代わりに脱保護剤を用いることで、合成工程を短縮できると考えた。この時、配糖体の溶解性変化を考慮し脱保護反応ではバッチ式反応を選択した。条件検討の結果、NaH in oil (60% disp.) を用い後処理の試薬として Dowex H⁺ resin を酸性となるまで加えると TES 基の脱保護まで進行し、2 工程収率 95% で C-28 位サポニン **4Aa** を合成できた。一方、Dowex H⁺ resin の量を調節し中性条件にした場合、C-3 位 TES サポニン **5Aa** を得た。また、脱保護剤を臭化亜鉛 (II) とした場合、TES 基選択的な脱保護が進行し、C-3 位のみをヒドロキシ基としたアクセプター **6Aa** を収率 78% で合成できた。また、D-fucose Ac ドナー **2g** を用い、TES サポニン **5Ag** を新たに合成できた (Table 1)。

Table1 マイクロフロー式 C-28 位配糖化・脱保護連続反応法の検討



Entry	Reaction conditions	Product	Yield (%)
1	NaH (10 eq.), MeOH, r.t., 40 min, then, Dowex H ⁺ resin to pH 4	4Aa	95
2	NaH (10 eq.), MeOH, r.t., 40 min, then, Dowex H ⁺ resin to pH 7	5Aa	75
3	ZnBr ₂ (10 eq.), H ₂ O (10 eq.) CH_2Cl_2 , r.t., 30 min	6Aa	78
4	NaH (10 eq.), MeOH, r.t., 40 min, then, Dowex H ⁺ resin to pH 7	5Ag	80

3. マイクロフロー式オレアノール酸 C-3 位配糖化を用いたビスデスモシドサポニンの合成⁵⁾

続いてアクセプター **6Aa** を用いオレアノール酸 C-3 位配糖化の検討を行った。検討の結果、流速 0.6 mL/min の常温条件下で 1 当量の **6Aa** に対し、1.5 当量のベンゾイル D-glucose イミダートドナー **7a** と 1 当量の TMSOTf を用いた場合に収率 83% で C-3 位配糖化が進行することを見出した。そこで、前述の配糖化・脱保護連続反応を応用しマイクロフロー式 C-3 位配糖化・バッチ式脱保護連続反応を行い、**8Aa**, **8Ab**, **8Ae** を収率約 40% 台で合成できた (Figure 2)。

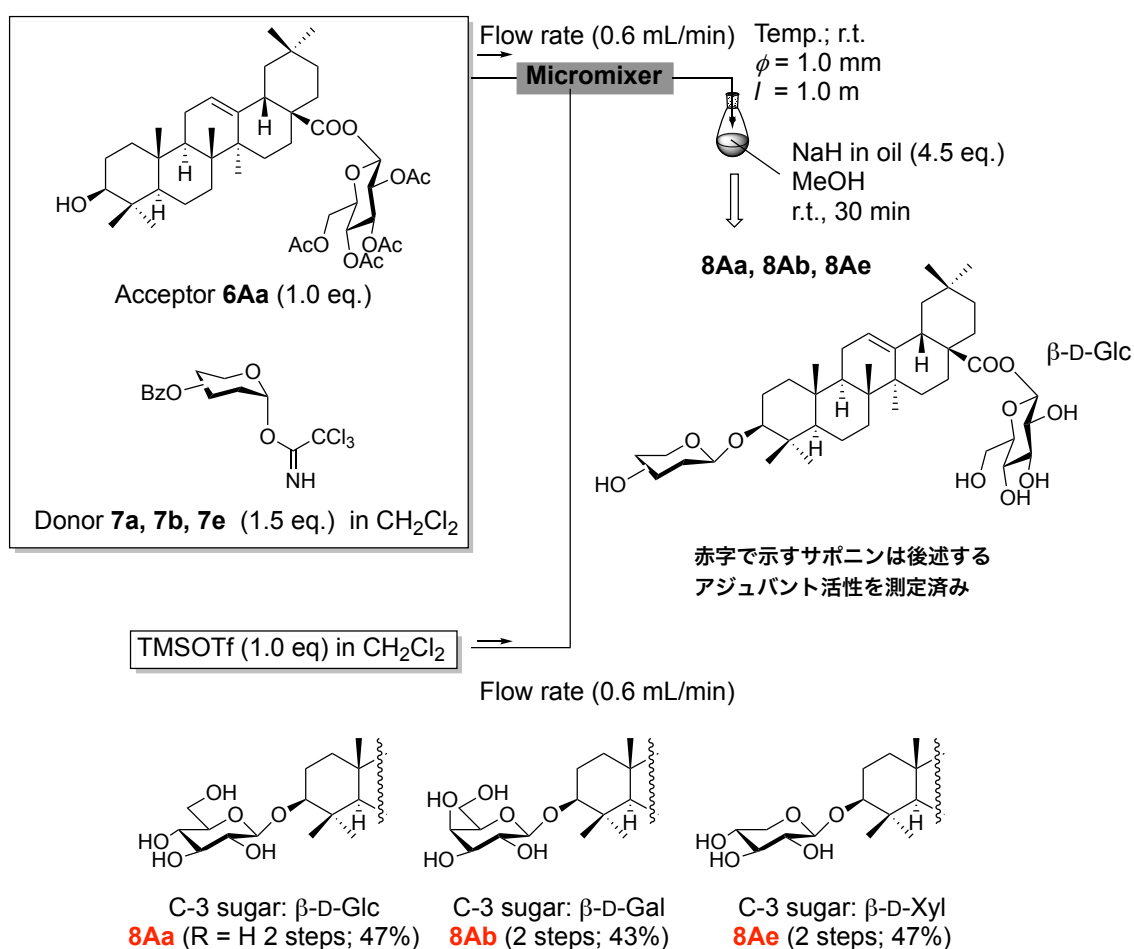
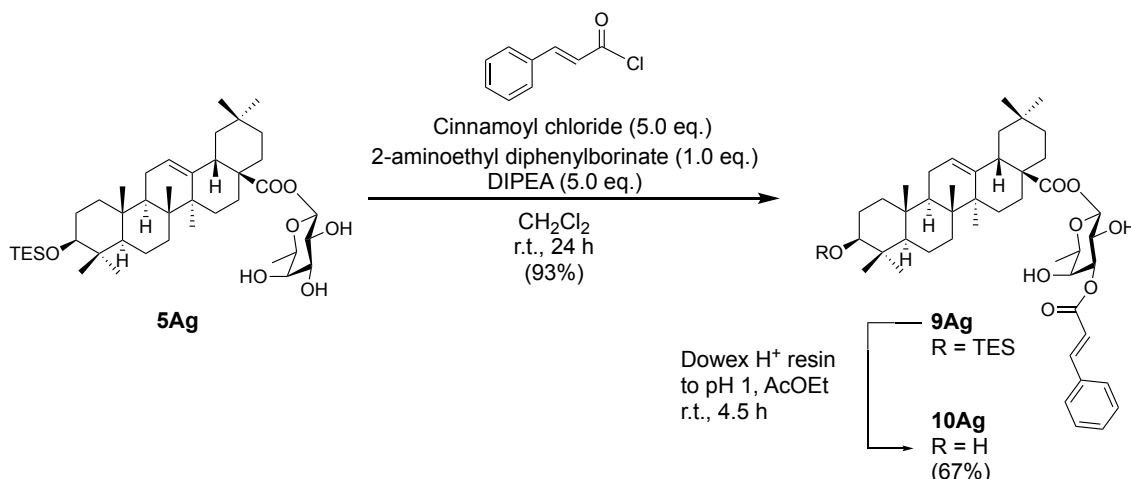


Figure 2 マイクロフロー式 C-3 位配糖化・脱保護連続反応法を用いたビスデスモシドサポニン **8Aa**, **8Ab**, **8Ae** の合成

4. 位置選択的桂皮酸エステル化を用いたオレアノール酸桂皮酸含有サポニン誘導体の合成

配糖化・脱保護連続反応はサポニンの供給に有効で D-fucose 体 **5Ag** の合成時の様に反応性の低いドナーを用いた場合にはバッチ式合成よりも高収率で配糖体が得られた。そこで、**5Ag** を用いて位置選択的桂皮酸エステル化の検討を行った。即ち、桂皮酸結合型ドナーを用いたサポニン合成では桂皮酸の二重結合の異性化が課題であり、解決方策として合成の最終段階で桂皮酸を導入する方法論の確立が必要であった³⁾。検討の結果、2-aminoethyl diphenylborinate を化学量論量用いることで、D-fucose の 3' 位選択的な桂皮酸エステル化が進行することを見出した⁷⁾。カラム精製後に得た **9Ag** に対し、Dowex H⁺ resin を用いて TES 基の脱保護を行い、C-28 位桂皮酸含有 D-fucose サポニン **10Ag** を Z 体への異性化を伴うことなく収率 67% で新たに合成できた (**Scheme 2**)。



Scheme 2 桂皮酸含有オレアノール酸サポニン **10Ag** の合成

5. 種々のアグリコン・糖鎖を用いたマイクロフロー式 C-3 位サポニンの合成

マイクロフロー式配糖化・バッチ式脱保護連続反応法を利用し、種々の C-3 位変換型サポニンの合成を行った。C-3 位サポニンライブラリーは、

①糖鎖を D-glucose とし合計 8 種のトリテルペンとステロール骨格を用いた C-3 位サポニン **12B-Ia**

②アグリコンをオレアノール酸とし 10 種の糖鎖を用いた C-3 位サポニン **12Aa-k**

とした (**Figure 3, 4**)。トリテルペノイドサポニン **12Aa-k** と **12B-Da** はカルボキシ基をベンジル (Bn) 基で保護したアクセプター **11A-D** を基質とし、Bn サポニン **13Aa-k** と **13B-Da** を中間体として精製し合成した。

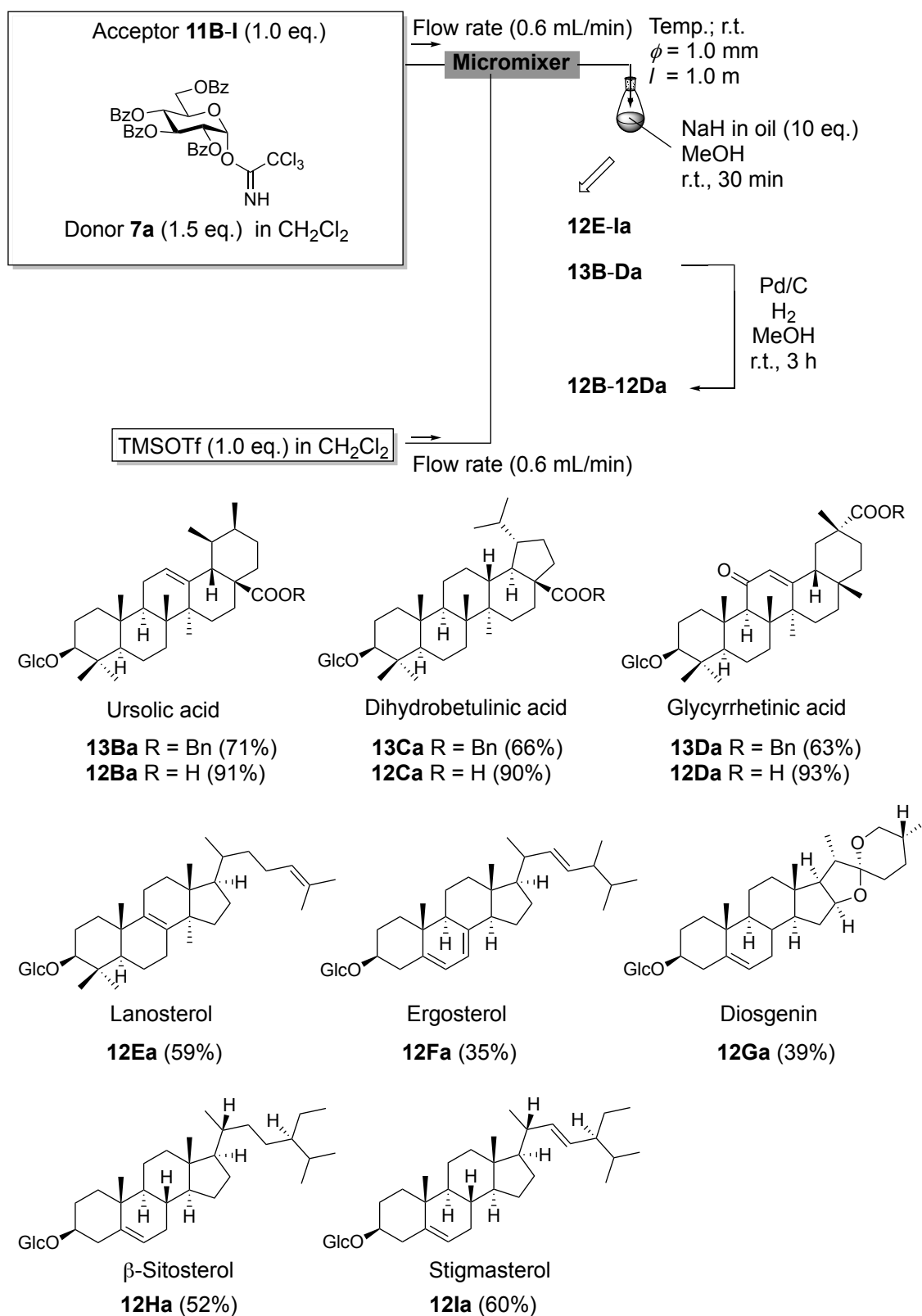


Figure 3 種々のアグリコンを用いたマイクロフロー式 C-3 位配糖化・脱保護連続反応法を用いた C-3 位モノグルコシドサポニン **12B-Ia** の合成

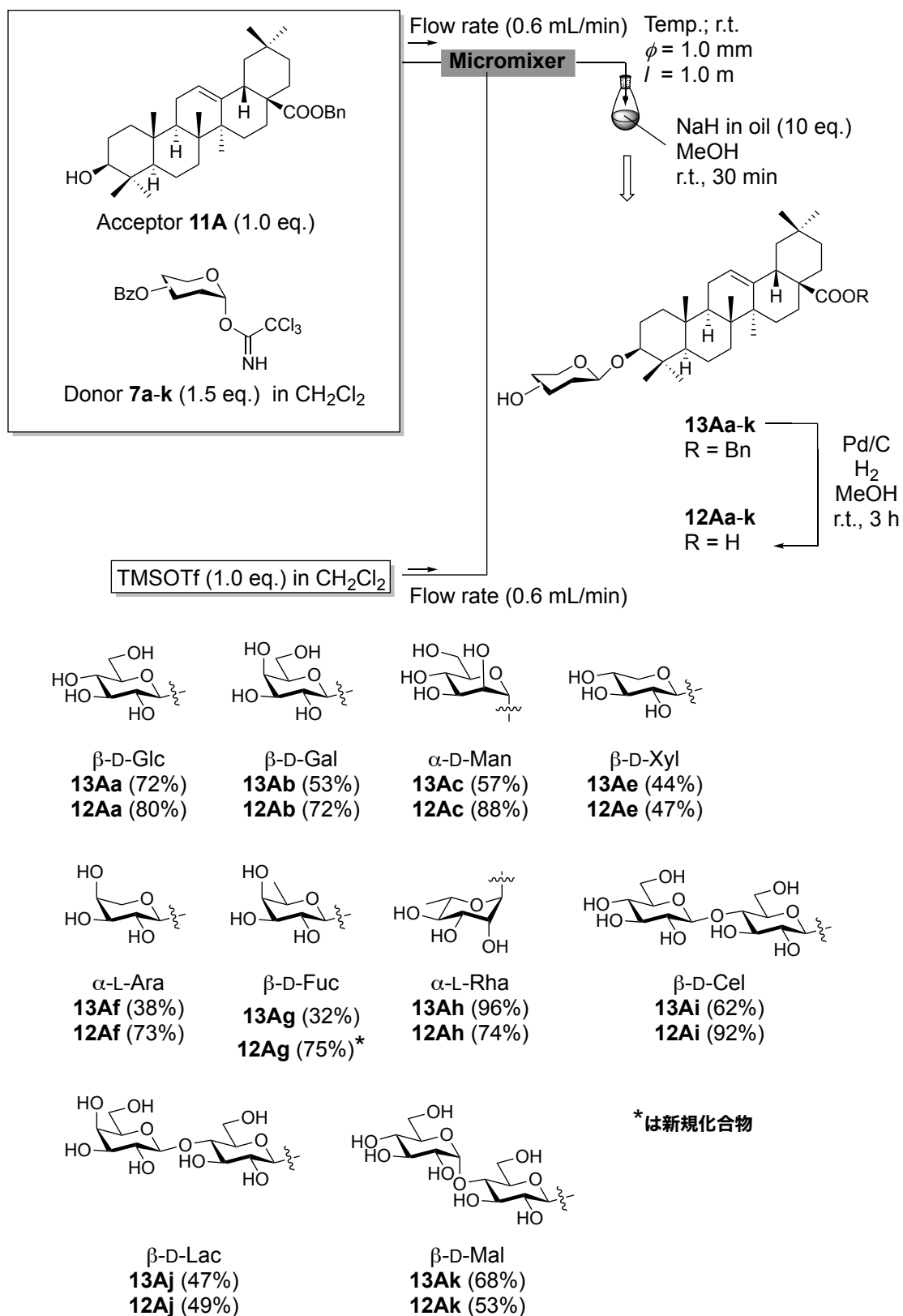


Figure 4 マイクロフロー式 C-3 位配糖化・脱保護連続反応法を用いたオレアノール酸 C-3 位サポニン **12Aa-k** の合成

【サポニン誘導体ライブラリーの構造活性相関の検討】^{8,9)}

1. 臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration, CMC) ・溶血作用 (Table 2)

オレアノール酸 C-28 位サポニン **4Aa-l** 及び **10Ag** は溶血作用 (HD_{50} : 陽性対照群の溶血作用を 100%とした時 50%の溶血率を示す濃度で表す) を示さず、その CMC は β -D-glucose, xylose, melibiose を有する **4Aa, e, l**を除いて 10 μ M 程度であった。一方、ビスデスモシドサポニン **8Aa, b, e** ではそれぞれ同程度の CMC を示したが **8Aa** のみが溶血作用を発現した。C-3 位サポニン **12Aa-k** 及び **12B-Ia** では溶血作用を発現するアグリコン骨格がオレアノール酸、ウルソール酸、ジヒドロベツリン酸であり、それぞれの CMC は 13 μ M 以下であった。各種ステロイド及びトリテルペンのラノステロール、グリチルレチン酸は C-28 位カルボキシ基含有トリテルペンと比較し高い CMC を示す傾向にあり、溶血作用を発現しなかった (NHA: No Hemolytic Activity)。各種天然サポニンではジギトニン (陽性対照群) とオンジサポニン B が溶血作用を発現し、それぞれ $HD_{50} < CMC$ 、 $CMC < HD_{50}$ の関係性にあることが確認された。

2. 構造活性相関の考察

サポニンの溶血作用の作用機作は CMC 以下の場合にはモノマー状態のサポニンが脂質二重層のコレステロールと結合し、膜構造のベシクル化に伴い細胞膜を破壊する。CMC 以上の場合ではミセル状態のサポニンが直接的に膜構造を破壊すると考えられている¹⁰⁾。上記の結果から溶血作用を発現したサポニン誘導体群の濃度はいずれも CMC 以上であり、溶血作用の発現増強に關与する構造・官能基¹⁰⁾は次の 3 点が考えられた (Figure 5)。

- 1) トリテルペン C-28 位遊離カルボキシ基
- 2) トリテルペン C-3 位糖鎖 (β -D-glucose が最も強い)
- 3) トリテルペン 6 員環 (E 環) 及び二重結合 (C 環)

サポニンの CMC ・溶血作用 ・化学構造の関係性は構造の特徴から、

- 1) $HD_{50} < CMC$
- 2) $CMC < HD_{50}$
- 3) NHA, $CMC < 150$
- 4) NHA, $150 < CMC$

の 4 つに分類することができた。

Table 2 サポニンライブラリーの CMC・溶血作用

サポニン	アグリコン	糖鎖		サポニンの性質	
		C-3位	C-28位	CMC (μM)	溶血作用 (HD ₅₀ , μM)
4Aa	オレアノール酸	-	β-D-Glc	101	NHA
4Ab	オレアノール酸	-	β-D-Gal	<12.6	NHA
4Ac	オレアノール酸	-	α-D-Man	<12.6	NHA
4Ad	オレアノール酸	-	β-D-Glc A	<12.1	NHA
4Ae	オレアノール酸	-	β-D-Xyl	106	NHA
4Af	オレアノール酸	-	α-L-Ara	<13.2	NHA
4Ag	オレアノール酸	-	β-D-Fuc	13	NHA
4Ah	オレアノール酸	-	α-L-Rha	<12.9	NHA
4Ai	オレアノール酸	-	β-D-Cel	10	NHA
4Aj	オレアノール酸	-	β-D-Lac	<10	NHA
4Ak	オレアノール酸	-	β-D-Mal	<10	NHA
4Al	オレアノール酸	-	β-D-Mel	39.9	NHA
10Ag	オレアノール酸	-	β-D-Fuc, Cinnamoyl	<10.6	NHA
8Aa	オレアノール酸	β-D-Glc	β-D-Glc	80	320
8Ab	オレアノール酸	β-D-Gal	β-D-Glc	80	NHA
8Ae	オレアノール酸	β-D-Xyl	β-D-Glc	83	NHA
12Aa	オレアノール酸	β-D-Glc	-	<12.6	25
12Ab	オレアノール酸	β-D-Gal	-	<12.6	25
12Ac	オレアノール酸	α-D-Man	-	<12.6	400
12Ae	オレアノール酸	β-D-Xyl	-	<13.2	53
12Af	オレアノール酸	α-L-Ara	-	<13.2	53
12Ag	オレアノール酸	β-D-Fuc	-	<12.9	50
12Ah	オレアノール酸	α-L-Rha	-	<12.9	207
12Ai	オレアノール酸	β-D-Cel	-	<10	39
12Aj	オレアノール酸	β-D-Lac	-	<10	39
12Ak	オレアノール酸	β-D-Mal	-	<10	80
12Ba	ウルソール酸	β-D-Glc	-	<12.6	200
12Ca	ジヒドロベツリン酸	β-D-Glc	-	<12.6	400
12Da	グリチルレチン酸	β-D-Glc	-	98.8	NHA
12Ea	ラノステロール	β-D-Glc	-	26.5	NHA
12Fa	エルゴステロール	β-D-Glc	-	14	NHA
12Ga	ジオスゲニン	β-D-Glc	-	<13.5	NHA
12Ha	β-シトステロール	β-D-Glc	-	27	NHA
12Ia	スチグマステロール	β-D-Glc	-	27.1	NHA
Tenuifolin	プレセネゲニン	β-D-Glc	-	367	NHA
オンジサポニンB	プレセネゲニン	D-Glc	β-D-Fuc, β-D-Xyl, α-L-Rha x 2, β-D-Gal	20	40
ジギトニン	ジオスゲニン	β-D-Glc x 2, β-D-Xyl β-D-Gal x 2	-	12.7	12.7
グリチルリチン	グリチルレチン酸	β-D-Glc A x 2	-	152	NHA
サイコサポニンb2	サイコサポゲニン	β-D-Glc, β-D-Fuc	-	80	NHA
アストラガロシドIV	シクロアルタン	β-D-Xyl	-	156	NHA
ジンセノシドRg1	ダンマレン	-	-	>312	NHA

濃度勾配 5% DMSO-saline (500~7.8 μg/mL) n = 2~3

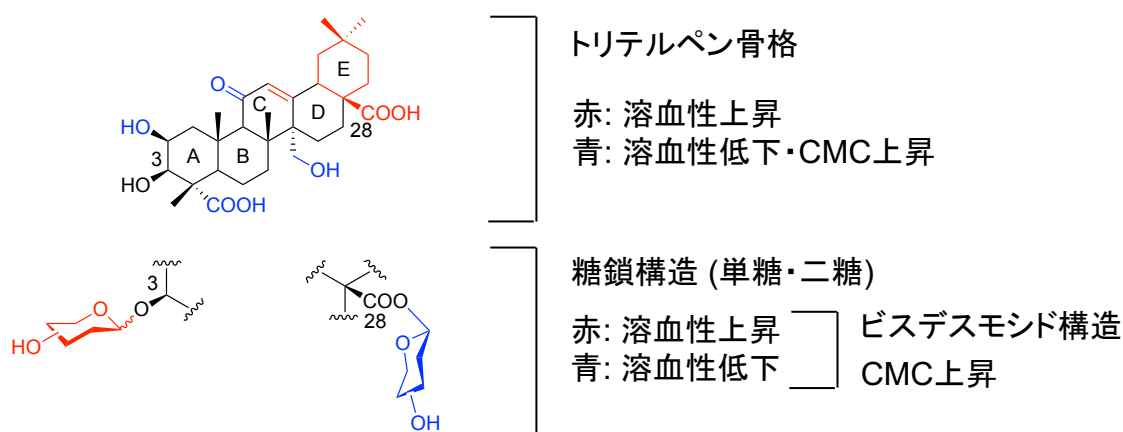


Figure 5 サポニン誘導体ライブラリーの CMC・溶血作用の構造活性相関

【総括】

マイクロフロー式サポニン合成法を用い、合計 35 種類のサポニン誘導体ライブラリー (14 種類のオレアノール酸 C-28 位サポニン、3 種類のオレアノール酸ビスデスモンドサポニン、18 種類の C-3 位サポニン) を構築できた。サポニンライブラリーの性質データの知見は溶血作用の消失・生物活性の賦与を指向した誘導体の設計や *in vivo* 生物活性試験の実験計画を設定する一助になることが期待される。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、各種機器データを測定して頂きました本学化学系共有機器室 佐藤倫子先生及び長井賢一郎先生に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は平成 28 年度笹川科学研究助成、平成 30 年度長井記念薬学研究支援事業による奨励金を受け行いましたので深く感謝いたします。

【References】

- 1) Fukumura, M.; Ando, H.; Hirai, Y.; Toriizuka, K.; Ida, Y.; Kuchino, Y. *J. Nat. Med.* **2009**, 63, 181–188.
- 2) Nagai, T.; Suzuki, Y.; Kiyohara, H.; Susa, E.; Kato, T.; Nagamine, T.; Hagiwara, Y.; Tamura, S.; Yabe, T.; Aizawa, C.; Yamada, H. *Vaccine* **2001**, 19, 4824–4834.
- 3) Shirahata, T.; Nagai, T.; Hirata, N.; Yokoyama, M.; Katsumi, T.; Konishi, N.; Nishino, T.; Makino, K.; Yamada, H.; Kaji, E.; Kiyohara, H.; Kobayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 1747–1755.
- 4) Yoshida, J.; Takahashi, Y.; Nagaki, A. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9896–9904.
- 5) Konishi, N.; Shirahata, T.; Yokoyama, M.; Katsumi, T.; Ito, Y.; Hirata, N.; Nishino, T.; Makino, K.; Sato, N.; Nagai, T.; Kiyohara, H.; Yamada, H.; Kaji, E.; Kobayashi,

- Y. J. Org. Chem.* **2017**, 82, 6703–6719.
- 6) Comet X-01 micromixer: <http://homepage3.nifty.com/techno-applications/>
- 7) Lee, D.; Taylor, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3724–3727.
- 8) Chen, Z.; Duan, H.; Tong, X.; Hsu, P.; Han, L.; Yang, S.; Liu, W.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **2018**, 81, 465–474. b) Ngoc, N.; Vo, Q.; Odette, E.; Muranaka, T. *J. Nat. Med.* **2017**, 71, 50–58.
- 9) Silva, P. Da; Eyraud, V.; Carre-pierrat, M.; Sivignon, C.; Rahioui, I.; Royer, C.; Gressent, F. *BMC Chem. Biol.* **2012**, 12, 1–9.
- 10) Lorent, J. H.; Quetin-Leclercq, J.; Mingeot-Leclercq, M. P. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 8803–8822.

【論文目録】

主論文

1)

Konishi Naruki; Shirahata Tatsuya, Yokoyama Masaki, Katsumi Tatsuya, Ito Yoshikazu, Hirata Nozomu, Nishino Takashi, Makino Kazuishi, Sato Noriko, Nagai Takayuki, Kiyohara Hiroaki, Yamada Haruki, Kaji Eisuke, Kobayashi Yoshinori

Synthesis of Bisdesmosidic Oleanolic Acid Saponins via a Glycosylation-Deprotection Sequence under Continuous Microfluidic/Batch Conditions.

The Journal of Organic Chemistry, **2017**, 82, 6703–6719.

参考論文

1)

Shirahata Tatsuya, Nagai Takayuki, Hirata Nozomu, Yokoyama Masaki, Katsumi Tatsuya, **Konishi Naruki**, Nishino Takashi, Makino Kazuishi, Yamada Haruki, Kaji Eisuke, Kiyohara Hiroaki, Kobayashi Yoshinori.

Syntheses and mucosal adjuvant activity of simplified oleanolic acid saponins possessing cinnamoyl ester

Bioorganic Medicinal Chemistry, **2017**, 25, 1747–1755.